

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 17, 1979, pp. 251–256

## Gaschromatographische Bestimmung von Hydroxyprolin in biologischem Material des Menschen

Von W. Woiwode, Dagmar List und H. Weichardt

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. H. Weichardt) der Universität Tübingen

(Eingegangen am 28. August/15. November 1978)

**Zusammenfassung:** Die Methode der gaschromatographischen Aminosäureanalyse wurde auf die Bestimmung von *L*-Hydroxyprolin in biologischem Material des Menschen übertragen.

Die quantitative Bestimmung von *L*-Hydroxyprolin kann durch gaschromatographische Enantiomerentrennung nach Zusatz einer bekannten Menge allo-*D*-Hydroxyprolin zur Probe erfolgen, da dieser chemisch äquivalente Standard während der Derivatisierung allen Veränderungen in gleicher Weise wie die zu bestimmende *L*-Verbindung ausgesetzt ist. Die Vorteile gegenüber bisherigen Bestimmungsmethoden liegen in der höheren Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und im geringeren Probenbedarf.

Gleichzeitig ist diese Arbeit ein Anwendungsbeispiel für chirale polymere Phasen, die es gestatten, die Aminosäurederivate einer Probe gaschromatographisch nicht nur untereinander, sondern auch in die jeweiligen Enantiomerenpaare aufzutrennen.

### *Quantitative analysis of L-hydroxyproline in human biological material by gas-chromatography*

**Summary:** Quantitative amino acid analysis by gas chromatography was applied to the determination of 4-hydroxy-*L*-proline in biological material.

After addition of a known amount of allo-4-hydroxy-*D*-proline, quantitative analysis of 4-hydroxy-*L*-proline can be performed by gas chromatographic separation of the amino acid enantiomers; since the standard and sample have identical chemical behaviour, they respond identically during derivatization. The accuracy, reproducibility, and sample requirement of this procedure are more advantageous than those of hitherto existing methods.

This study is also an example of the application of chiral stationary phases, which permit the simultaneous separation of amino acids and amino acid enantiomers.

### **Einführung**

Freie und gebundene Aminosäuren treten im Blut und im Urin in unterschiedlichen Konzentrationen auf. Während die quantitative Erfassung jeder einzelnen Aminosäure auf Grund der komplexen physiologischen Zusammenhänge für diagnostische Belange (1) im allgemeinen noch nicht sinnvoll ist, kommt der Hydroxyprolinbestimmung als Parameter des Kollagenstoffwechsels (2) große Bedeutung zu. So ermöglicht etwa die Kenntnis der Hydroxyprolinkonzentration bzw. -menge im Blut und im Urin Aussagen über den Kollagenstoffwechsel unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche, auf photometrischen und gaschromatographischen Prinzipien ba-

sierende Bestimmungsmethoden entwickelt, von denen hier nur einige angeführt sein sollen (3, 4, 5).

Da diese Methoden z. T. aufwendig und relativ ungenau sind, übertrugen wir die von H. Frank, G. J. Nicholson & E. Bayer entwickelte Methode der gaschromatographischen Aminosäureanalyse (6) auf die Hydroxyprolinbestimmung, um eine genaue und reproduzierbare Analyse bei vertretbarem Zeitaufwand durchführen zu können.

### **Material und Methoden**

#### *Gaschromatographische Enantiomerentrennung (7)*

Die Verwendung von Glaskapillarsäulen, belegt mit der optisch aktiven Phase Chirasil-Val (8) gestattet es, durch Wahl eines geeigneten Temperaturprogrammes die Aminosäurederivate

einer Probe gaschromatographisch nicht nur untereinander, sondern auch in die jeweiligen Enantiomerenpaare aufzutrennen.

Eine racemische Aminosäure ergibt somit, bei völlig gleichen chemischen Eigenschaften des *D*- und *L*-Enantiomers, zwei Peaks im Chromatogramm.

Da in biologischem Material fast ausschließlich *L*-Aminosäuren gefunden werden, ist es möglich, durch Zusatz eines *D*-Aminosäuren-Testgemisches als Standard zur Probe jeder Aminosäure einen „eigenen“ inneren Standard hinzuzufügen.

Erfolgt dieser Zusatz noch vor der Derivatisierung der Probe, kann die quantitative Bestimmung direkt aus dem Verhältnis der jeweiligen *D*- und *L*-Peaks erfolgen, da der – chemisch gleiche – Standard unter den identischen Aufarbeitungsbedingungen allen Veränderungen in gleicher Weise unterworfen ist. Auch eine eventuelle Racemisierung der zu bestimmenden Aminosäure während der Derivatisierung (9, 10) kann über eine zweite gaschromatographische Enantiomerentrennung, durchgeführt ohne Zusatz des *D*-Aminosäuren-Testgemisches, korrigiert werden. Dieses Verfahren wurde im Folgenden auf die Bestimmung von Hydroxyprolin angewendet.

#### Vorbereitung der Urinproben

5 ml Urin werden mit 5 ml 10 mol/l HCl in einer zugeschmolzenen Glasampulle 14 Stunden bei 110 °C hydrolysiert.

Aliquote Anteile dieser Lösung werden für die gaschromatographische Bestimmung von freiem und gebundenem Hydroxyprolin direkt derivatisiert bzw. weiteren Reinigungsschritten unterworfen.

#### Reinigung der Proben

durch Ionenaustauschchromatographie (11)

##### Vorbereitung des Kationenaustauschers DOWEX 50 WX 8 (*H*<sup>+</sup>-Form)

Das Austauscherharz wird mit 3 mol/l NH<sub>4</sub>OH bedeckt, 30 min bei Raumtemperatur gerührt und auf einer Glasfritte D 3 scharf abgesaugt. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt.

Anschließend wird auf der Glasfritte mit bidest. Wasser bis zur neutralen Reaktion ausgewaschen.

Die Regeneration des Austauschers erfolgt mit 3 mol/l HCl. Dazu wird wie oben beschrieben dreimal je 30 min mit 3 mol/l HCl bei Raumtemperatur gerührt und abgesaugt. Mit bidest. Wasser wird neutral gewaschen.

##### Vorbereitung des Anionenaustauschers DOWEX 1 X 8 (Acetat-Form)

Das Austauscherharz wird wie oben beschrieben mit 3 mol/l KOH dreimal je 30 min bei Raumtemperatur gerührt und abgesaugt.

Auf der Glasfritte wird annähernd neutral gewaschen.

Die Regeneration des Austauschers erfolgt mit 3 mol/l CH<sub>3</sub>COOH.

Dazu wird wie oben beschrieben dreimal je 30 min mit 3 mol/l CH<sub>3</sub>COOH bei Raumtemperatur gerührt und abgesaugt.

Mit bidest. Wasser wird neutral gewaschen.

Mit den so vorbehandelten Austauschern werden Glassäulen mit den Abmessungen 1 cm × 15 cm etwa zur Hälfte gefüllt.

Mit bidest. Wasser wird äquilibriert.

#### Reinigung über den Kationenaustauscher

10 ml Urinhydrolysat werden zur Trockene eingedampft, in 5 ml 0,1 mol/l HCl aufgenommen und auf die Austauschersäule gegeben. Anschließend wird mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 ml/min eluiert und noch dreimal mit je 2 ml 0,1 mol/l HCl nachgewaschen. Anschließend wird fünfmal mit je 10 ml bidest. Wasser bei einer Geschwindigkeit von 5 ml/min eluiert. Das Eluat wird verworfen. Die Aminosäuren werden mit 3 mol/l NH<sub>4</sub>OH eluiert. Dazu werden fünf separate Volumina von je 2 ml NH<sub>4</sub>OH auf die Säulen gegeben. Die

Elution erfolgt mit 3 ml/min. Es wird noch fünfmal mit je 5 ml bidest. Wasser nachgewaschen. Die die Aminosäuren enthaltenden alkalischen Fraktionen werden vereinigt.

Die Bestimmung von freiem und gebundenem Hydroxyprolin kann aus aliquoten Anteilen dieser Lösung erfolgen. Die verbliebene Lösung wird für die Trennung über den Anionenaustauscher zur Trockene eingedampft.

#### Reinigung über den Anionenaustauscher

Der eingedampfte Rückstand nach der Kationenaustauschertrennung wird in 5 ml 0,1 mol/l KOH gelöst und auf die Austauschersäule gegeben. Mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min wird eluiert.

Die Säule wird anschließend mit insgesamt 200 ml bidest. Wasser bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/min gewaschen.

Die Aminosäuren werden mit 3 mol/l CH<sub>3</sub>COOH eluiert. Dazu werden bei einer Geschwindigkeit von 3 ml/min zunächst fünfmal je 3 ml CH<sub>3</sub>COOH auf die Säule gegeben, anschließend noch fünfmal je 5 ml bidest. Wasser.

Die die Aminosäuren enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und eingedampft.

Aliquote Anteile des Rückstandes werden für die gaschromatographische Enantiomerentrennung verwendet.

#### Vorbereitung der Plasmaproben

Zur Abtrennung von Proteinen wird 1 ml Blutplasma mit 5 ml wäßriger-Pikrinsäurelösung (10 g/l) versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird anschließend zehn Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Die die Aminosäuren und überschüssige Pikrinsäure enthaltende überstehende klare Lösung wird dekantiert.

Die klare Lösung wird zur Abtrennung der Pikrinsäure wie oben beschrieben auf den Kationenaustauscher DOWEX 50 gegeben.

#### Derivatisierung der Proben

für die gaschromatographische Racemattrennung

Aliquote Anteile der jeweiligen Probenlösung werden eingedampft.

Ausgehend von 1 ml Urin oder Plasma liegen die absoluten Stoffmengen der einzelnen Aminosäuren etwa zwischen 0,05 und 0,5 Mikromol.

#### Veresterung

Der trockene Rückstand wird mit 0,5 ml einer Lösung, die 1,5 mol HCl in 1 l Propanol- (2) enthält, versetzt und, sofern erforderlich, durch Ultraschallbehandlung homogenisiert. Die Probe wird auf 110 °C erhitzt und 60 Minuten bei dieser Temperatur belassen.

#### Acylierung

Nach der Veresterung wird das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen. Nach Aufnehmen in 250 µl Methylchlorid und Zugabe von 50 µl Perfluorpropionsäureanhydrid wird auf 110 °C erhitzt und 10 Minuten bei 110 °C belassen. Nach Abblasen bis zur Trockene mit Stickstoff wird die Probe zur Analyse in etwa 250 µl Methylchlorid aufgenommen.

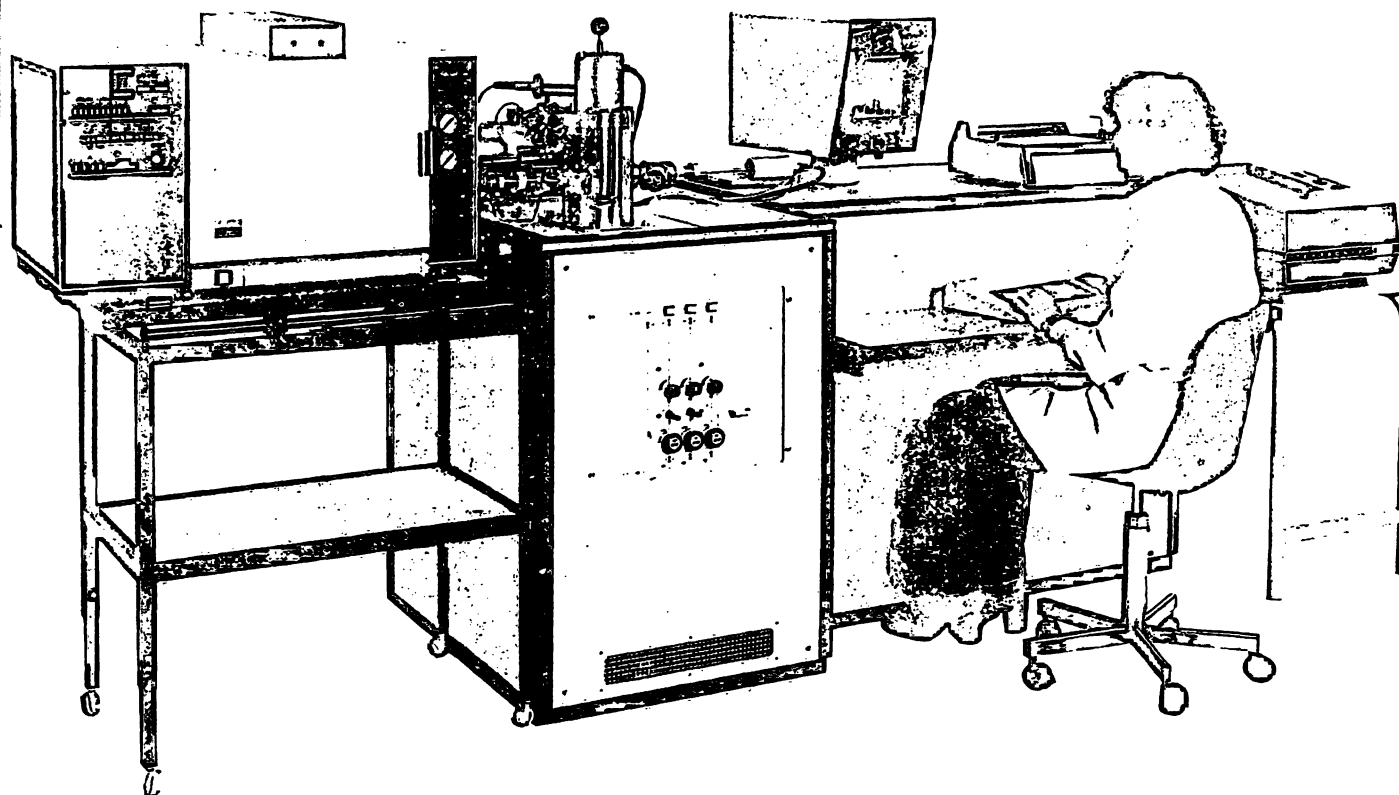
#### Gaschromatographische Racemattrennung

Die Messungen wurden an einem Gaschromatographen der Firma Carlo Erba, Modell 2151 AC, ausgerüstet mit einem Integrator der Firma Spectra-Physics, System 1, durchgeführt.

Ausgehend von 0,4 µl des Probengemisches erfolgen die Trennungen auf einer Glaskapillarsäule mit den Abmessungen 20 m × 0,3 mm, die nach bekannten Vorschriften (12) mit Chirasil-Val (13) belegt worden war. Chirasil-Val besteht aus einem Organosiloxan, an das ein *L*-Aminosäurederivat, in diesem Fall *L*-Val-tert.-butylamid, peptidartig geknüpft ist (8). Die Zahl der theoretischen Böden der benutzten Säule lag bei etwa 65 000.

# The MAT44S is the Solution to Your Analytical Problems

44 S 01e 379



## GC/MS system MAT44S\*

\*Our GC/MS/DS package prices will also ease your funding problems.

See the MAT44S at theACHEMA'79 exhibition:  
hall 6/III, booth FG1-4. Frankfurt, June 17-23, 79.



Varian MAT GmbH, Postfach 144062  
Barkhausenstr. 2, 2800 Bremen 14  
F.R. Germany, Telefon (0421) 54 93 -1

Varian MAT Mass Spectrometry,  
25 Hanover Rd., Florham Park, NJ 07932,  
Phone (201) 822-3700, U.S.

# Lieferanten-Nachweis

## • Autoklaven

HEINICKE INSTRUMENTS  
Laborgerätebau GmbH  
8223 Trostberg, Pf. 12 03  
Ruf 0 86 21/20 85, FS 5 63 110

## • Bakteriologie

OTTO NORDWALD KG  
2000 Hamburg 50, Heinrichstr. 5  
Ruf 040/43 28 27

## • Brutschränke

HEINICKE INSTRUMENTS  
Laborgerätebau GmbH  
8223 Trostberg, Pf. 12 03  
Ruf 0 86 21/20 85, FS 5 63 110

## • Chromatographie-Pumpen

VERDER (DEUTSCHLAND) GMBH  
4000 Düsseldorf, Luegallee 108  
Ruf 02 11/57 40 79  
FS: 0 85 85 539

## • Digitale Verdünnungsgeräte

**HAMILTON**

Hamilton Deutschland GmbH  
Postfach 11 04 27  
Otto-Röhm-Str. 74  
D-6100 Darmstadt  
Ruf 0 61 51/8 50 85-86, FS 04 19 684

## • Digitale Dispensiergeräte

**HAMILTON**

Hamilton Deutschland GmbH  
Postfach 11 04 27  
Otto-Röhm-Str. 74  
D-6100 Darmstadt  
Ruf 0 61 51/8 50 85-86, FS 04 19 684

## • Elektrophorese

CARL ZEISS  
7082 Oberkochen, Pf. 13 69

## • Filterphotometer

CARL ZEISS  
7082 Oberkochen, Pf. 13 69

## • Flammenphotometer

CARL ZEISS  
7082 Oberkochen, Pf. 13 69

## • Gasdichte Spritzen

**HAMILTON**

Hamilton Deutschland GmbH  
Postfach 11 04 27  
Otto-Röhm-Str. 74  
D-6100 Darmstadt  
Ruf 0 61 51/8 50 85-86, FS 04 19 684

## • Infrarot-Spektralphotometer

CARL ZEISS  
7082 Oberkochen, Pf. 13 69

## • Klinische Reagenzien

 **PIERCE EUROCHEMIE B.V.**  
P.O. BOX 1151-ROTTERDAM THE NETHERLANDS  
PHONE 01860-4822 - TELEX 21676

## • Küvetten

HELLMA GMBH & CO.  
7840 Müllheim/Baden  
Ruf 0 76 31/55 09 und 55 00  
FS 07 72 987

## • Küvetten-Absaugpumpen

HELLMA GMBH & CO.  
7840 Müllheim/Baden  
Ruf 0 76 31/55 09 und 55 00  
FS 07 72 987

## • Küvetten-Reinigungsmittel

HELLMA GMBH & CO.  
7840 Müllheim/Baden  
Ruf 0 76 31/55 09 und 55 00  
FS 07 72 987

## • Küvetten-Ständer

HELLMA GMBH & CO.  
7840 Müllheim/Baden  
Ruf 0 76 31/55 09 und 55 00  
FS 07 72 987

## • Küvetten-Trocken- schleudern

HELLMA GMBH & CO.  
78 40 Müllheim/Baden  
Ruf 0 76 31/55 09 und 55 00  
FS 07 72 987

## • Laborspülmittel

*deconex®*  
*das umfassende Reinigungspro-  
gramm für Labors aller Bereiche*  
BORER CHEMIE AG  
Zürcher Str. 125  
Postfach 352  
CH-8952 Schlieren-Zürich  
Ruf (01) 7 30 15 35  
Telex CH 54 031 SPONA

## • Microliterspritzen®

**HAMILTON**

Hamilton Deutschland GmbH  
Postfach 11 04 27  
Otto-Röhm-Str. 74  
D-6100 Darmstadt  
Ruf 0 61 51/8 50 85-86, FS 04 19 684

## • Mikroskope

HERTEL & REUSS  
3500 Kassel, Quellhofstr. 67  
Ruf 05 61/8 30 06  
WILL WETZLAR KG  
Optische Werke  
Postfach 40  
6331 Nauborn-Wetzlar  
Ruf 0 64 41/2 30 71-4  
CARL ZEISS  
7082 Oberkochen, Pf. 13 69

## • pH-Meßgeräte + pH-Glaselektroden

INGOLD pH-Meßtechnik  
6000 Frankfurt 1  
Postf. 3308, Ruf 06 11/29 53 01

## • Photometer

CARL ZEISS  
7082 Oberkochen, Pf. 13 69

## • Polarimeter

CARL ZEISS  
7082 Oberkochen, Pf. 13 69

## • Radioaktive Stoffe

AMERSHAM BUCHLER  
3300 Braunschweig, Postf. 1120  
Ruf 0 53 07/46 93-97

## • Reinigungsmittel

*deconex®*  
*das umfassende Reinigungspro-  
gramm für Labors aller Bereiche*  
BORER CHEMIE AG  
Zürcher Str. 125  
Postfach 352  
CH-8952 Schlieren-Zürich  
Ruf (01) 7 30 15 35  
Telex CH 54 031 SPONA

## • Spektralphotometer

CARL ZEISS  
7082 Oberkochen, Pf. 13 69

## • Schlauchpumpen

VERDER (DEUTSCHLAND) GMBH  
4000 Düsseldorf, Luegallee 108  
Ruf 02 11/57 40 79, FS: 0 85 85 539

## • Sterilisierpapiere

J.C. BINZER  
3559 Hatzfeld  
Ruf 0 64 67/3 18, FS: 04 82 224

## • Trockenschränke

HEINICKE INSTRUMENTS  
Laborgerätebau GmbH  
8223 Trostberg, Pf. 12 03  
Ruf 0 86 21/20 85, FS 5 63 110

## • Waschautomaten für Laborglas

HEINICKE INSTRUMENTS  
Laborgerätebau GmbH  
8223 Trostberg, Pf. 12 03  
Ruf 0 86 21/20 85, FS 5 63 110

## • Zentrifugen

BERTHOLD HERMLE KG  
7209 Gosheim, Postfach 1240  
Ruf 0 74 26/ 10 61

Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte 5 min isotherm bei 80 °C, anschließend mit einem Temperaturprogramm von 4 °C/min bis 200 °C. Parameter: Trägergas Wasserstoff, Eingangsdruck 0,38 kg/cm<sup>2</sup>. Splitverhältnis 1:20. Detektor: FID, Elektrometereinstellung 1 × 1 × 16. Temperatur des Einspritzblocks: 250 °C.

#### Massenspektrometrische Untersuchung

Jeweils 0,4 µmol *L*-Hydroxyprolin und allo-*D*-Hydroxyprolin wurden 24 Stunden mit 2 ml 6 mol/l HCl bei 110 °C unter Luftausschluß „hydrolysiert“ und wie oben beschreiben derivatisiert.

Die anschließende gaschromatographische Untersuchung zeigte, daß bei der „Hydrolyse“ weniger als 1 Prozent Racemisierung zu erwarten ist.

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte in der Kopplung GC/MS nach der Trennung über Chirasil-Val (8) auf einem Massenspektrometer MAT-112 der Firma Varian MAT, Bremen. In der Kopplung GC/MS wurde Helium als Trägergas verwendet.

#### Parameter für die Messung mittels Elektronenstoß-Ionisation

Elektronenenergie 80 eV, 0,7 mA; Temperatur der Ionenquelle 200 °C, Interface 220 °C; SEV-Spannung etwa 1,9 kV.

#### Parameter für die Messung mittels chemischer Ionisation

Reaktionsgas Methan; Elektronenenergie 160 eV, 0,7 mA; Temperatur der Ionenquelle 200 °C, Interface 220 °C; SEV-Spannung etwa 1,9 kV.

### Ergebnisse

#### Gaschromatographische Trennung von Aminosäuren in biologischem Material

##### Analyse von Urinproben

Zur Bestimmung der freien und gebundenen Aminosäuren wurde eine Urinprobe unmittelbar nach der sauren Hydrolyse derivatisiert. Das resultierende Spektrum ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Die gefundenen Anteile an *D*-Aminosäuren entstehen während der Hydrolyse der Proben (9, 10).

Überraschenderweise führt die beschriebene Derivatisierung zu den flüchtigen Aminosäurederivaten be-

reits zu einem relativ übersichtlichen Spektrum. Durch die fehlende Vorreinigung werden jedoch störende Peaks hervorgerufen, zudem wird die Säule stark belastet. Bei den folgenden Analysen wurde daher in Anlehnung an die Methode von Zumwalt (11) zunächst eine Trennung über einen Kationenaustauscher durchgeführt.

Hochgereinigte Urinproben wurden durch Trennung der Probengemische über einen Kationen- und zusätzlich über einen Anionenaustauscher erhalten (Abb. 2).

##### Analyse von Plasma

Die Plasmaproben wurden von Proteinen befreit und ebenfalls über den Kationenaustauscher getrennt (Abb. 3).

#### Quantitative Hydroxyprolinbestimmungen

*L*-Hydroxyprolin und allo-*D*-Hydroxyprolin wurden wie im experimentellen Teil beschrieben derivatisiert und einzeln und im Gemisch der gaschromatographischen Enantiomerentrennung unterworfen.

Dabei zeigte sich, daß die verwendete *D*-Standard-Verbindung durch weniger als 0,1 % *L*-Hydroxyprolin verunreinigt war.

In der Kopplung GC/MS wurden zur Absicherung zudem die EI- und CI-Massenspektren aufgenommen, die für beide Verbindungen identisch sind (Abb. 4).

Den Urinproben wurde zur Bestimmung des freien und gebundenen Hydroxyprolins der Standard allo-*D*-Hydroxyprolin nach der sauren Hydrolyse zugesetzt. Die Bestimmungen erfolgten direkt aus dem Urinhydrolysat nach Derivatisierung der Probe, nach der Reinigung des Hydrolysates über den Kationenaustauscher und nach der zusätzlichen Reinigung über den Anionenaustauscher.

Zur Bestimmung des freien Hydroxyprolins in der gleichen Urinprobe wurde die Probe nach Zusatz des Stan-

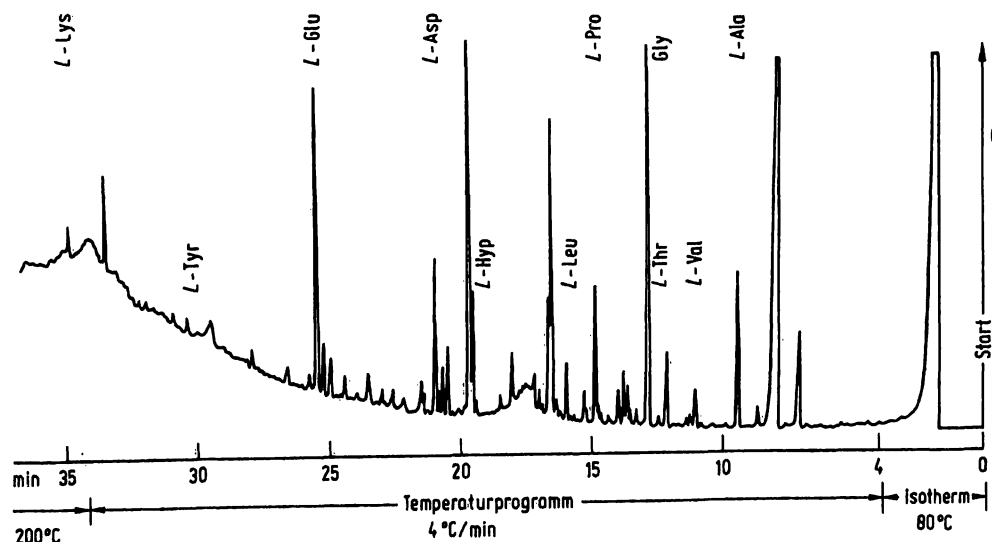


Abb. 1. Chromatogramm nach Hydrolyse und Derivatisierung der Urinprobe.

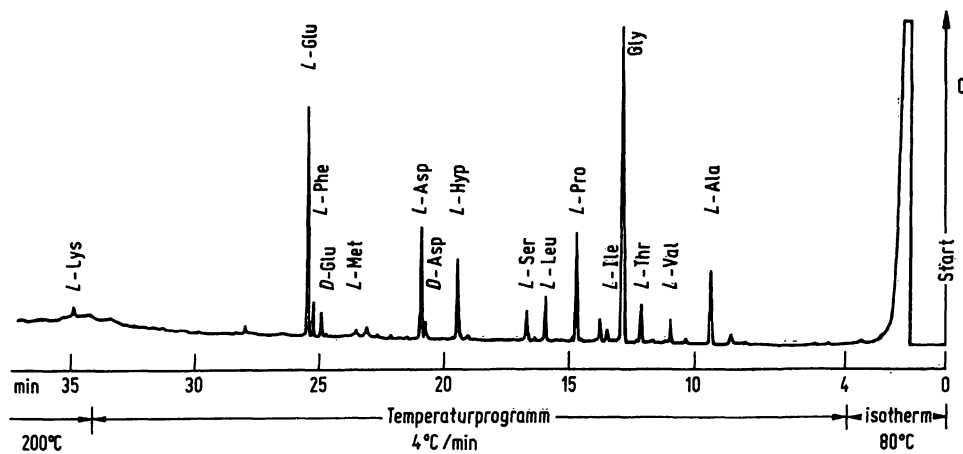


Abb. 2. Chromatogramm nach Hydrolyse, Trennung über Kationen- und Anionenaustauscher und Derivatisierung der Urinprobe.

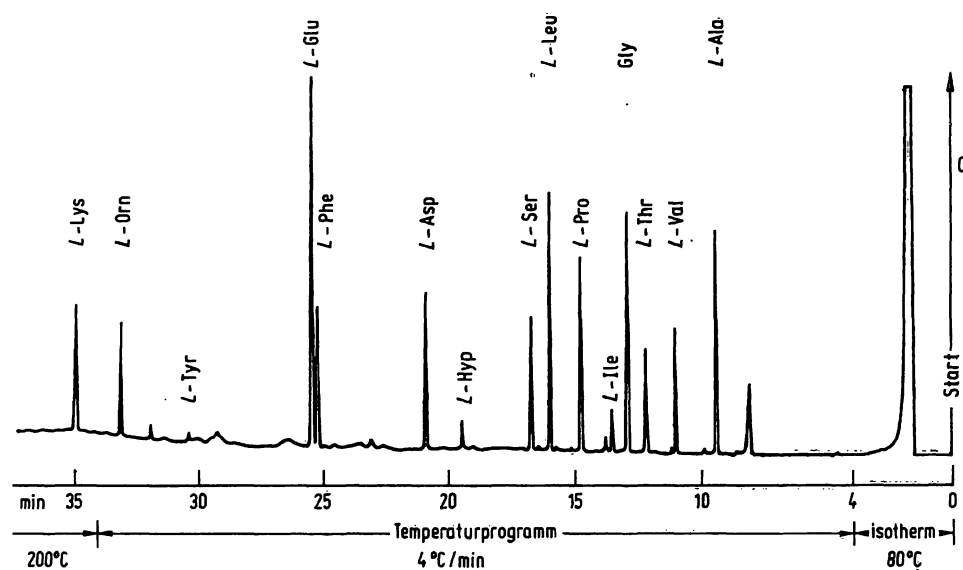


Abb. 3. Chromatogramm nach Pikrinsäurefällung, Trennung über den Kationenaustauscher und Derivatisierung der Plasma probe.

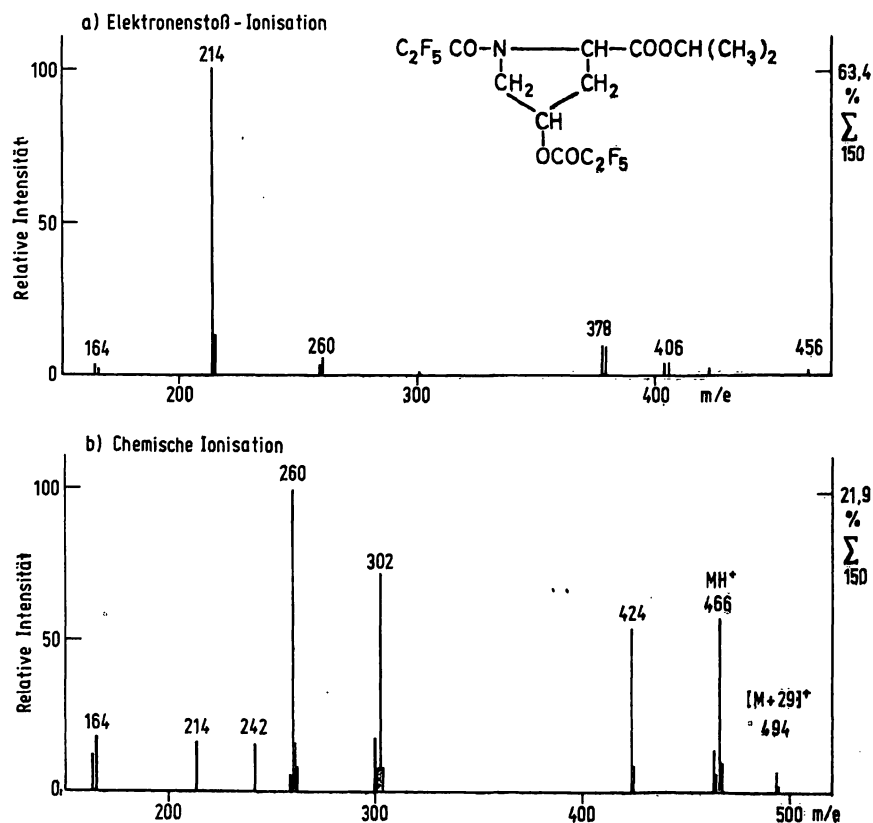


Abb. 4. Massenspektren von allo-D- und L-Hydroxyprolin.  
a) Spektrum nach Elektronenstoß-Ionisation.  
b) Spektrum nach chemischer Ionisation.

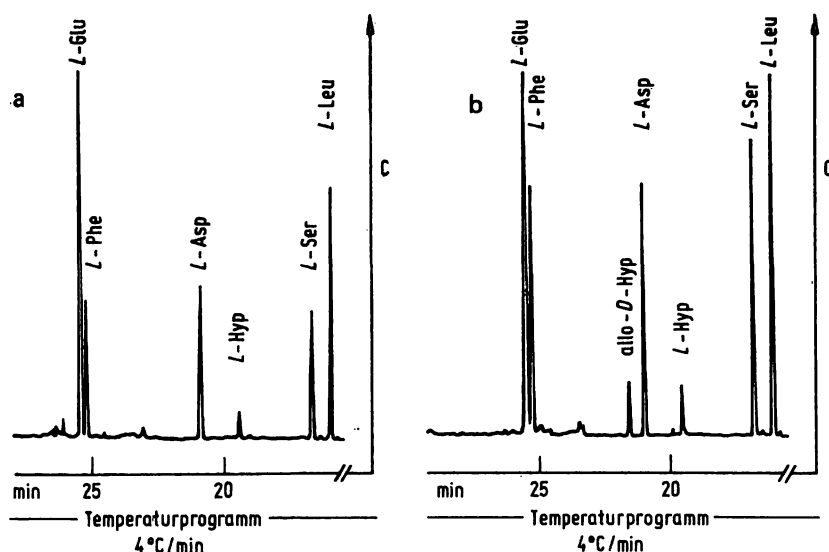


Abb. 5. Ausschnitte aus den Chromatogrammen der Plasmaprobe nach Pikrinsäurefällung, Trennung über Kationenaustauscher und Derivatisierung.

a) ohne Zusatz.

b) mit Zusatz von 2,5 µg allo-D-Hydroxyprolin.

Tab. 1. Auswertung der quantitativen Hydroxyprolinbestimmungen.

Probe	Volu- men	Reinigungs- schritt	Zusatz allo-D- Hydroxy- prolin	Gefun- dene Menge L-Hy- droxy- prolin
	(ml)		(µg)	(mg/l)
Urin- hydrolysat	1	—	20	25,28 <sup>1</sup>
Urin- hydrolysat	1	Kationen- austauscher	20	25,24 <sup>1</sup>
Urin- hydrolysat	1	Kationen- austauscher + Anionen- austauscher	20	25,10 <sup>1</sup>
Urin	1	Kationen- austauscher + Anionen- austauscher	20	0,95 <sup>2</sup>
Plasma	1	Pikrinsäure- fällung + Kationen- austauscher	2,5	2,27 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> freies und gebundenes Hydroxyprolin

<sup>2</sup> freies Hydroxyprolin

dards unter Auslassung des Hydrolyseschrittes über den Kationen- und Anionenaustauscher gereinigt und derivatisiert.

Der Plasmaprobe wurde der Standard noch vor der Pikrinsäurefällung zugefügt. Die teilweise Wiedergabe der Chromatogramme erfolgt in Abbildung 5.

Die Auswertung aller durchgeführten Messungen ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Die Auswertung erfolgte nach dem in der Literatur angegebenen Verfahren (6) über die Peak-Höhen, wobei die

während der Hydrolyse auftretende Racemisierung von Probe und Standard korrigiert wird.

Für die Bestimmungen wurden gleiche Mengen einer Urinprobe der jeweiligen Aufarbeitung unterzogen. Die Meßwerte einer Probe waren auf  $\pm 2$  Prozent reproduzierbar, die angeführten Werte sind Mittelwerte aus je 5 Messungen.

Trotz völlig unterschiedlicher Aufarbeitung liegen die gefundenen Werte für freies und gebundenes L-Hydroxyprolin in der Urinprobe innerhalb 0,5% Abweichung vom Mittelwert.

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte an Blut- und Urinproben eines Patienten, der sich schwere Verbrennungen zugezogen hatte.

Der Wert von  $\sim 2,2$  mg/l für das freie Hydroxyprolin im Plasma ist gegenüber dem Normalwert (14) signifikant erhöht.

### Diskussion der Ergebnisse

In den vorausgegangenen Abschnitten wurde die Anwendung der gaschromatographischen Aminosäureanalyse (7) auf die Analyse von biologischem Material beschrieben.

Durch Verwendung des chemisch äquivalenten Standards allo-D-Hydroxyprolin, Reinigung der Proben durch chromatographische Verfahren und gaschromatographische Analyse dürfte es sich bei der beschriebenen Methode um eine der genauesten derzeit verfügbaren Hydroxyprolinbestimmungen handeln.

Die benötigten Probenmengen können dabei gegenüber bisherigen Bestimmungsmethoden stark reduziert werden.

Der Zeitaufwand für eine komplette Analyse, ausgehend von Urinhydrolysat bzw. Blutplasma, beträgt ca. 2 Stunden für die Urinprobe ohne Vorreinigung, 4 Stunden für

die hochgereinigte Urinprobe und etwa 3 Stunden für die Plasmaprobe. Da die eigentliche gaschromatographische Bestimmung bei Verwendung eines geeigneten Temperaturprogrammes lediglich etwa 20 Minuten dauert, ist ein größerer Probenanfall bei serienweiser Derivatisierung dennoch kurzfristig zu bewältigen.

Der Mehraufwand wird zudem durch den ungleich größeren Informationsgehalt der Spektren kompensiert: wie aus den Abbildungen 1 bis 3 hervorgeht, werden neben Hydroxyprolin gleichzeitig nahezu alle anwesenden *L*-Aminosäuren in einer Messung erfaßt.

Von *Baily* et al. (15) wurden z. B. neben der „Leit-aminosäure“ Hydroxyprolin noch Lysin, Prolin, Alanin und Glycin für die Kollagenbildung bei Meerschweinchen nach der Applikation von Quarzstäuben herangezogen.

Eine quantitative Bestimmung auch dieser Aminosäuren neben Hydroxyprolin in biologischem Material ist nach der hier verwendeten Methode (6) ohne weiteres möglich (16).

Mit der erreichbaren Genauigkeit sollte es zudem möglich sein, zuverlässige Hydroxyprolin-Normalwerte zu bestimmen, da gerade diesen Punkt betreffend die Literaturwerte stark streuen.

### Danksagung

Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. E. Bayer, Herrn Dr. H. Frank und Herrn G. Nicholson, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, für die Überlassung von Chirasil-Val.

### Literatur

1. Franzen, E. (1978), *Z. Gesamte Hyg. Ihre Grenzgeb.* 24, 12–20.
2. Nagelschmidt, M. & Struck, H. (1977), *Med. Welt* 28, 334–335.
3. Stegemann, H. (1958), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 311, 41–45.
4. Haury, H. (1972), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 10, 25–28.
5. Mee, J. M. L. (1973), *J. Chromatogr.* 87, 155–161.
6. Frank, H., Nicholson, G. J. & Bayer, E., *J. Chromatogr.*, im Druck.
7. Frank, H., Nicholson, G. J. & Bayer, E. (1977), *J. Chromatogr. Sci.* 15, 174–176.
8. Frank, H., Nicholson, G. J. & Bayer, E. (1978), *Angew. Chem.* 90, 396–398.
9. Neuberger, A. (1948), *Adv. Protein Chem.* 4, 339–340.
10. Woiwode, W., Frank, H., Nicholson, G. J. & Bayer, E., zur Veröffentlichung eingereicht.
11. Zumwalt, R. W., Roach, D. & Gehrke, C. W. (1970), *J. Chromatogr.* 53, 171–194.
12. Schulte, E. (1976), *Chromatographia* 9, 315–320.
13. Chirasil-Val ist erhältlich von Applied Science Laboratories, P. O. Box 440, College Station, Pennsylvania 16801 (USA).
14. Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen 7. Auflage (1968), Herausgeber: J. R. Geigy A. G., Pharma, Basel.
15. Baily, P., Kilroe-Smith, T. A. & Harington, J. A. (1964), *Arch. Environ. Health* 8, 547–554.
16. Woiwode, W., Weichardt, H., Nicholson, G. J. & Bayer, E., unveröffentlichte Ergebnisse.

Prof. Dr. med. H. Weichardt  
Institut für Arbeits- und Sozialmedizin  
der Universität Tübingen  
Wilhelmstraße 27  
D-7400 Tübingen